



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **29 DEC. 2003**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITE

26bis, rue de Saint-Petersbourg

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

75800 Paris Cédex 08

Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: 15/01/2003 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: 0350002 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: 75 DATE DE DÉPÔT: 15/01/2003	Marie DUCREUX L'AIR LIQUIDE 75 quai d'Orsay 75321-PARIS-CEDEX-07 France
Vos références pour ce dossier: S6093 ALSI OP	

1 NATURE DE LA DEMANDE	
Demande de brevet	
2 TITRE DE L'INVENTION	
UTILISATION DE XENON OU DE N2O DANS LE TRAITEMENT DES DETERIORATIONS CELLULAIRES CEREBRALES POST-ISCHEMIQUES	
3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE	
Pays ou organisation	Date N°
4-1 DEMANDEUR	
Nom	L'AIR LIQUIDE SANTE (INTERNATIONAL)
Suivi par	Olivier PITTIS
Rue	10 rue Cognacq-Jay
Code postal et ville	75007 PARIS
Pays	France
Nationalité	France
Forme juridique	Société anonyme
N° SIREN	552 134 728
Code APE-NAF	671C
N° de téléphone	01 40 62 54 49
N° de télécopie	01 40 62 56 95
Courrier électronique	olivier.pittis@airliquide.com
5A MANDATAIRE	
Nom	DUCREUX
Prénom	Marie
Qualité	Liste spéciale, Pas de pouvoir
Gabinets ou Société	L'AIR LIQUIDE
Rue	75 quai d'Orsay
Code postal et ville	75321-PARIS-CEDEX 07
N° de téléphone	01 40 62 53 75
N° de télécopie	01 40 62 56 95
Courrier électronique	marie.ducieux@airliquide.com

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

26bis, rue de Saint-Petersbourg

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

75800 Paris Cédex 08

Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01 42.94.86.54

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: DATE DE DÉPÔT:	Marie DUCREUX L'AIR LIQUIDE 75 quai d'Orsay 75321 PARIS CEDEX 07 France
Vos références pour ce dossier: xx	

1 NATURE DE LA DEMANDE	
Demande de brevet	
2 TITRE DE L'INVENTION	
UTILISATION DE XENON OU DE N2O DANS LE TRAITEMENT DES DETERIORATIONS CELLULAIRES CEREBRALES POST-ISCHEMIQUES	
3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE	Pays ou organisation Date N°
4-1 DEMANDEUR	
Nom Suivi par Rue Code postal et ville Pays Nationalité Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF N° de téléphone N° de télécopie Courrier électronique	AIR LIQUIDE SANTE (INTERNATIONAL) Olivier PITTIS 10 rue Cognacq-Jay 75007 PARIS France France Société anonyme 552 134 728 671C 01 40 62 54 49 01 40 62 56 95 olivier.pittis@airliquide.com
5A MANDATAIRE	
Nom Prénom Qualité Cabinet ou Société Rue Code postal et ville N° de téléphone N° de télécopie Courrier électronique	DUCREUX Marie Liste spéciale, Pas de pouvoir L'AIR LIQUIDE 75 quai d'Orsay 75321 PARIS CEDEX 07 01 40 62 53 75 01 40 62 56 95 marie.ducieux@airliquide.com

6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS		Fichier électronique	Pages	Détails
Texte du brevet		textebrevet.pdf	11	D-7, R-3, AB-1
Dessins		dessins.pdf		, figures 8
Désignation d'inventeurs				
7 MODE DE PAIEMENT				
Mode de paiement		Prélèvement du compte courant		
Numéro du compte client		516		
8 RAPPORT DE RECHERCHE				
Etablissement immédiat				
9 REDEVANCES JOINTES				
	Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt	EURO	0.00	1.00	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)	EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème	EURO	15.00	4.00	60.00
Total à acquitter	EURO			380.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Signé par

Signataire: FR, Air Liquide, M. Ducreux

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)

BEST AVAILABLE COPY

L'invention porte sur l'utilisation de protoxyde d'azote (N_2O)
5 et/ou de xénon ou d'un donneur de N_2O ou de xénon pour
fabriquer tout ou partie d'un médicament destiné à traiter ou à
prévenir une détérioration post-ischémique de cellules cérébrales,
en particulier une détérioration consécutive à un accident
vasculaire cérébral (AVC), notamment tout ou partie d'un
10 médicament gazeux inhalable, chez l'homme ou l'animal.

Dans les ischémies cérébrales consécutives à un AVC et, de
façon générale, dans les AVC, on note habituellement au plan
neurochimique, une altération fonctionnelle de nombreux systèmes
de neurotransmission, notamment une augmentation de la
15 libération de glutamate dont l'excitotoxicité et la contribution à la
mort neuronale sont connues, comme le rappelle *Dirnagl et al.*,
Trends Neurosci; 22 : 391, 1999.

Par ailleurs, au plan fonctionnel, on observe dans le cas
d'ischémies globales chez le rat, une augmentation de l'activité
locomotrice, notamment décrite par *Wang et Corbett*, *Brain Res.*
20 533: 78, 1990; *Baldwin et al.*, *Neurodegeneration* 2: 139, 1993;
dont le développement est généralement attribué à une altération
des fonctions cognitives de reconnaissance spatiales plutôt qu'à
une altération des fonctions sensori-motrices.

25 De fait, le rôle thérapeutique potentiel des antagonistes des
récepteurs glutamatergiques ionotropiques et métabotropiques a
été soupçonné, notamment par *Chazot*, *Curr Opin Invest Drugs* 1:
370, 2000; *Drian et al.*, *Neurochem Int* 38: 509, 2001.

Il apparaît aussi que les effets délétères des ischémies cérébrales avérées semblent impliquer des ischémies localisées qui auraient pour origine une excitotoxicité glutamatergique.

De fait, le thérapeutique potentiel des antagonistes des récepteurs glutamatergiques est souvent avancé dans le traitement de neuropathologies d'origine excitotoxique, en particulier les ischémies cérébrales, comme décrit par *Dirnagl et al., Trends Neurosci* 22: 391, 1999, et les troubles productifs, tel que décrit par *Benes, Brain-Res. Review* 31: 251, 2000.

10 Cependant, la physiologie des récepteurs glutamatergiques est complexe et il semble que les antagonistes à haute affinité peuvent également présenter des propriétés neurotoxiques, selon *Burns et al., Psychopharmacology* 115: 516, 1994.

Ainsi, un intérêt thérapeutique potentiel des antagonistes à 15 faible affinité, en particulier au NMDA, a été récemment proposé par *Palmer et Widzowski, Amino acids* 19: 151, 2000.

A ce jour, il n'existe cependant pas de médicament permettant de prévenir ou de traiter, au moins partiellement, les dégradations cellulaires cérébrales post-ischémiques consécutives 20 aux accidents vasculaires cérébraux.

La présente invention s'inscrit dans ce contexte et vise à proposer toute ou partie d'un médicament utilisable pour prévenir, diminuer ou traiter toute détérioration post-ischémique de cellules cérébrales notamment consécutive à un accident vasculaire 25 cérébral (AVC), chez l'homme ou l'animal.

L'invention concerne alors une utilisation de protoxyde d'azote (N₂O) et/ou de xénon ou d'un donneur de N₂O ou de xénon pour fabriquer tout ou partie d'un médicament destiné à traiter, à



minimiser ou à prévenir une détérioration post-ischémique de cellules cérébrales.

Selon le cas, l'utilisation de l'invention peut comprendre l'une ou plusieurs des caractéristiques techniques suivantes :

- 5 - tout ou partie du médicament gazeux est sous forme inhalable.
- la détérioration post-ischémique cérébrale résulte ou est consécutive à un accident vasculaire cérébral (AVC)
- le xénon ou l'agent donneur de xénon est sous forme gazeuse ou est compris dans un gaz ou un mélange gazeux.
- 10 - le protoxyde d'azote (N_2O) ou l'agent donneur de protoxyde d'azote est sous forme gazeuse ou est compris dans un gaz ou un mélange gazeux.
- le médicament contient une proportion efficace de protoxyde d'azote (N_2O) et/ou de xénon ou d'un donneur de N_2O ou de xénon.
- 15 - le médicament contient, en outre, au moins un autre composé gazeux choisi parmi l'oxygène, l'azote ou l'argon, de préférence de l'azote et de l'oxygène.
- 20 - le médicament contient une quantité inférieure à 60% en volume de xénon ou d'agent donneur de xénon, de préférence inférieure ou égale à 50% en volume.
- le médicament contient une quantité allant jusqu'à environ 80% en volume de N_2O ou d'agent donneur de N_2O , de préférence jusqu'à 75% de N_2O .
- 25 - le médicament contient de 19 à 25% en volume d'oxygène et éventuellement de l'azote.

L'invention concerne alors aussi un médicament inhalable à action neuroprotectrice cérébrale contenant une quantité efficace

de protoxyde d'azote (N_2O) et/ou de xénon, ou d'un donneur d'un tel composé, en particulier destiné à traiter, à minimiser ou à prévenir une détérioration post-ischémique de cellules cérébrales.

Selon le cas, le médicament de l'invention peut comprendre l'une ou plusieurs des caractéristiques techniques suivantes :

- il contient une quantité allant jusqu'à 80% en volume de N_2O ou une quantité inférieure à 60% en volume de xénon.
- il contient, en outre, de 19 à 25% en volume d'oxygène et éventuellement de l'azote.

L'idée à la base de la présente invention est de tirer partie des propriétés antagonistes des récepteurs NMDA du xénon ou du N_2O pour leur caractère neuroprotecteur dans la prévention ou le traitement de pathologies post-ischémiques consécutives aux accidents vasculaires cérébraux.

En effet, des travaux récents, réalisés in vitro, ont montré que le xénon et le N_2O peuvent potentiellement se comporter comme des antagonistes à faible affinité des récepteurs glutamatergiques au N-Méthyl-D-Aspartate NMDA (*Franks et al., Nature 396: 324, 1998; Jevtovic-Todorovic et al., Nature Med. 4: 460, 199 ; Yamakura and Harris, Anesthesiology, 20008*).

Partant de ces observations, des expérimentations ont été réalisées dans le cadre de la présente invention dans le but de déterminer les effets neuroprotecteurs du N_2O et du xénon sur la mort neuronale induite par ischémie cérébrale transitoire chez le rat.

Afin de démontrer l'effet bénéfique d'une administration de N_2O ou de xénon sur les cellules cérébrales consécutivement à une ischémie cérébrale, des rats adultes Sprague-Dawley de 350 g ont été soumis au protocole expérimental suivant.

Au jour 1, des ischémies focalisées ont été induites chez chacun des rats par occlusion artérielle cérébrale moyenne (Middle Cerebral Artery Occlusion = MCAO), pendant une durée de 1 h 30 minutes.

5 L'ischémie cérébrale focalisée transitoire par MCAO est obtenue de manière classique par introduction d'un fil 1 de nylon souple schématisé en Figure 1 (longueur 6.5 mm, diamètre 180 μ m) dont une portion 2 de l'extrémité proximale est de diamètre supérieur à celui du fil (longueur 3 mm, diamètre 380 μ m), à
10 l'intérieur du système vasculaire du rat jusque dans la région de l'hémisphère ipsilatéral de manière à y provoquer une embolie, i.e. une ischémie.

Ensuite, on procède à une reperfusion des rats pendant 10 à 20 minutes, puis on leur fait inhaler plusieurs mélanges gazeux, à
15 savoir :

- mélange n° 1 : air (témoin)
- mélange n° 2 : N₂O (75% vol) et le reste étant de l'oxygène (25%)
- mélange n° 3 : xénon (50 % vol) et le reste étant de
20 l'oxygène (20 à 25%) et de l'azote (30 à 25%, respect.).
- mélange n° 4 : xénon (75% vol) et le reste étant de l'oxygène (25%)

Au jour 2, soit 24 heures après la reperfusion, les rats sont tués, les cerveaux sont récupérés, congelés, découpés en fines
25 tranches de 40 μ m d'épaisseur, puis colorés au violet cresyl, comme montré en Figure 5.

A partir des tranches obtenues après coloration, le volume de mort neuronal est calculé de manière classique en utilisant un logiciel classique adapté disponible dans le commerce.

En effet, comme schématisé en figure 2, l'ischémie cérébrale engendre, en général, sous 24 heures, un infarctus dans la région ischémisée (pénumbra) conduisant à une mort neuronale des cellules cérébrales présentes dans une partie importante de cette région.

Les résultats obtenus lors de ces mesures ont été consignés sur les figures 3a à 3d qui permettent de visualiser l'effet neuroprotecteur post-ischémie cérébrale des mélanges n° 2 à 4 ci-dessus par comparaison au mélange n° 1 (air) servant de témoin.

10 Ainsi, la figure 3a montre clairement que l'inhalation par les rats de xénon (Xe) ou de protoxyde d'azote (N_2O) consécutivement à une ischémie permet de réduire notablement le volume total d'infarctus puisqu'une diminution de ce volume d'environ 50% peut être atteint en cas d'inhalation des mélanges n° 2 et n°3 en lieu et
15 place de l'air (mélange n° 1 servant de témoin), et de 30% environ lors de l'inhalation du mélange n° 4. A ce titre, on notera également que l'inhalation de 50% en volume de xénon (mélange n° 3) est plus efficace qu'une inhalation d'une dose plus élevée de xénon, à savoir 75% (mélange n° 4), ce qui laisse à penser que la
20 dose la plus efficace semble être plus proche de 50% que de 75% pour ce qui concerne le xénon.

Les figures 3b à 3d confirment les résultats de la figure 3a puisqu'elles permettent de constater que l'inhalation de xénon ou de N_2O permet de diminuer, respectivement, le volume d'infarctus
25 cortical (fig 3b), le volume d'infarctus striatal (fig. 3c) et le volume d'œdème (fig 3d) post-ischémiques par rapport à une inhalation d'air (témoin = mélange n° 1).

Partant de ce constat, des examens complémentaires ont été réalisés pour déterminer les effets neurotoxiques du xénon et du

protoxyde d'azote (N_2O), à différentes teneurs, par rapport à l'air sur les récepteurs cérébraux de type NMDA.

Les résultats de ces examens sont consignés sur la figure 4 qui montre clairement que l'administration de xénon ou de protoxyde d'azote engendre un volume (en mn^3) de récepteurs NMDA détériorés moins important que le témoin (air) et ce, avec le protoxyde d'azote dosé à 50% ou 75% en volume (reste = 25% de O_2) et le xénon dosé à 50% ou à 75% (reste = mélange 25% de O_2 + 25% de N_2 ou, respect., 25% de O_2).

10 Toutefois, il apparaît ainsi un effet neurotoxique variable selon le dosage administré conduisant aux constats que le N_2O à 75% et le xénon à 50% en volume sont davantage neuroprotecteurs que le N_2O dosé à 50% et le xénon dosé à 75%.

Autrement dit, ces données confirment qu'une administration
15 par inhalation de xénon dosé à 50% en volume (ou moins) ou de N_2O dosé à 75% en volume (ou moins) engendre une action neuroprotectrice vis-à-vis des ischémies cérébrales et autres maladies excitotoxiques analogues.

Le médicament inhalable selon l'invention est conditionné dans
20 des récipients de gaz sous pression telles des bouteilles de gaz, et est distribué au patient via un système d'administration de gaz adapté muni d'un masque respiratoire, d'une sonde trachéale ou analogue.

25

Revendications

1 - Utilisation de protoxyde d'azote (N_2O) et/ou de xénon ou
5 d'un donneur de N_2O ou de xénon pour fabriquer tout ou partie
d'un médicament destiné à traiter, à minimiser ou à prévenir une
détérioration post-ischémique de cellules cérébrales.

2 - Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce
10 que tout ou partie du médicament gazeux est sous forme inhalable.

3 - Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2,
caractérisée en ce que la détérioration post-ischémique cérébrale
résulte ou est consécutive à un accident vasculaire cérébral (AVC)
15

4 - Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3,
caractérisée en ce que le xénon ou l'agent donneur de xénon est
sous forme gazeuse ou est compris dans un gaz ou un mélange
gazeux.
20

5 - Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4,
caractérisée en ce que le protoxyde d'azote (N_2O) ou l'agent
donneur de protoxyde d'azote est sous forme gazeuse ou est
compris dans un gaz ou un mélange gazeux.
25

6 - Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5,
caractérisée en ce que le médicament contient une proportion
efficace de protoxyde d'azote (N_2O) et/ou de xénon ou d'un
donneur de N_2O ou de xénon.

BEST AVAILABLE COPY

7 - Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le médicament contient, en outre, au moins un autre composé gazeux choisi parmi l'oxygène, l'azote ou l'argon, de préférence de l'azote et de l'oxygène.

8 - Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le médicament contient une quantité inférieure à 60% en volume de xénon ou d'agent donneur de xénon, de préférence inférieure ou égale à 50% en volume.

9 - Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que le médicament contient une quantité allant jusqu'à 80% en volume de N_2O ou d'agent donneur de N_2O , de préférence jusqu'à 75% de N_2O .

10 - Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que le médicament contient de 19 à 25% en volume d'oxygène et éventuellement de l'azote.

11 - Médicament inhalable à action neuroprotectrice cérébrale contenant une quantité efficace de protoxyde d'azote (N_2O) et/ou de xénon, ou d'un donneur d'un tel composé.

12 - Médicament selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il contient une quantité allant jusqu'à 80% en volume de N_2O ou une quantité inférieure à 60% en volume de xénon.

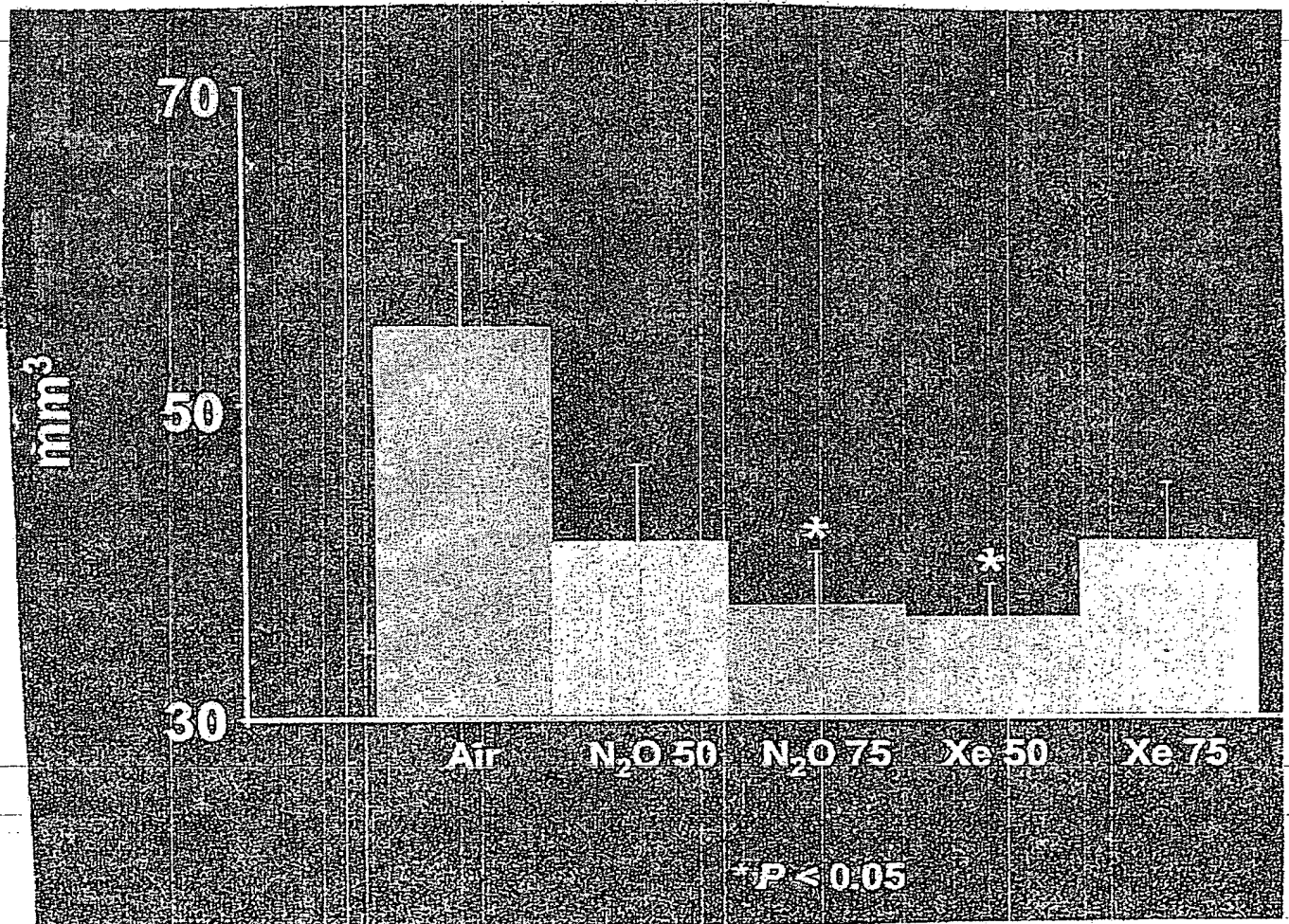
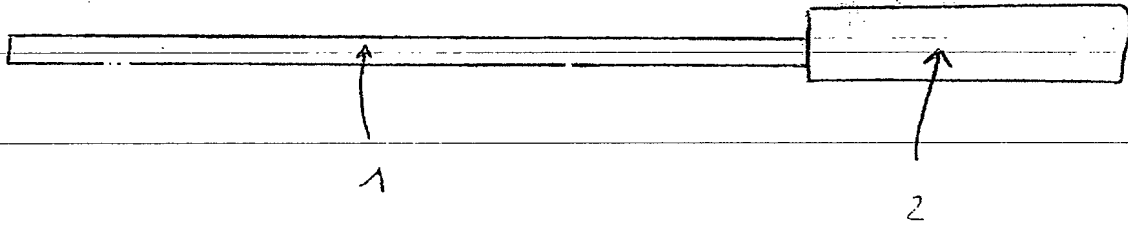
~~13~~ - Médicament selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce qu'il contient, en outre, de 19 à 25% en volume d'oxygène et éventuellement de l'azote.

~~5~~ ~~14~~ - Récipient de gaz sous pression contenant un médicament selon l'une des revendications 11 à 13, en particulier une bouteille de gaz.



-1/3

F-G 1



F G 4

1/3

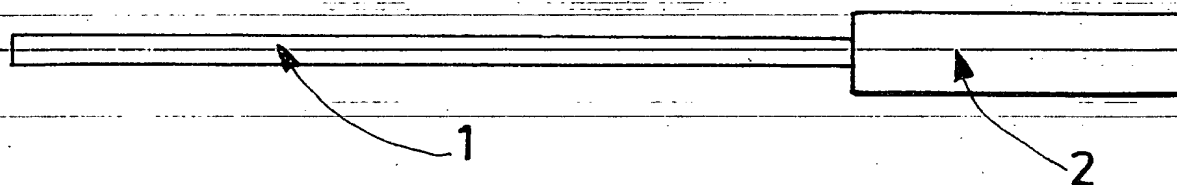
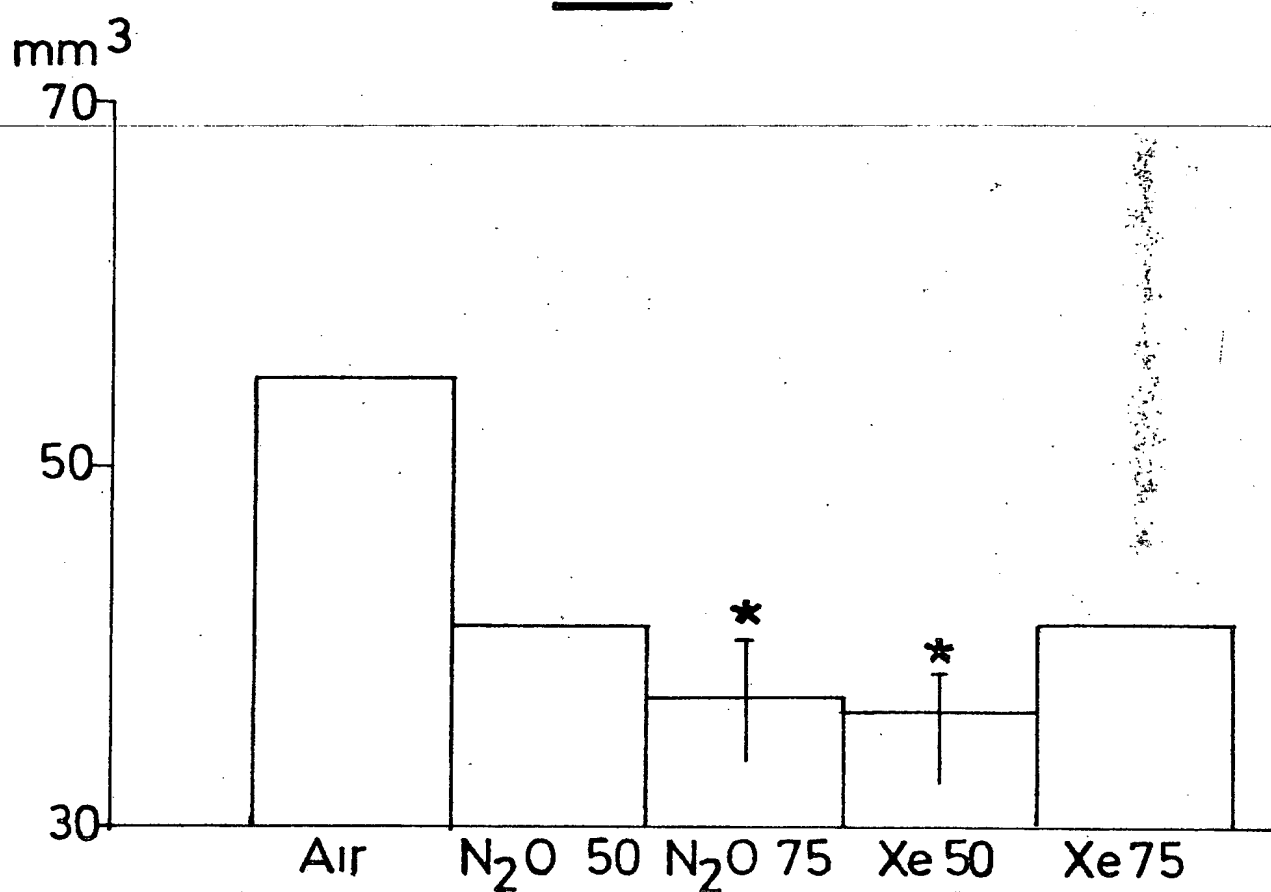


FIG.1

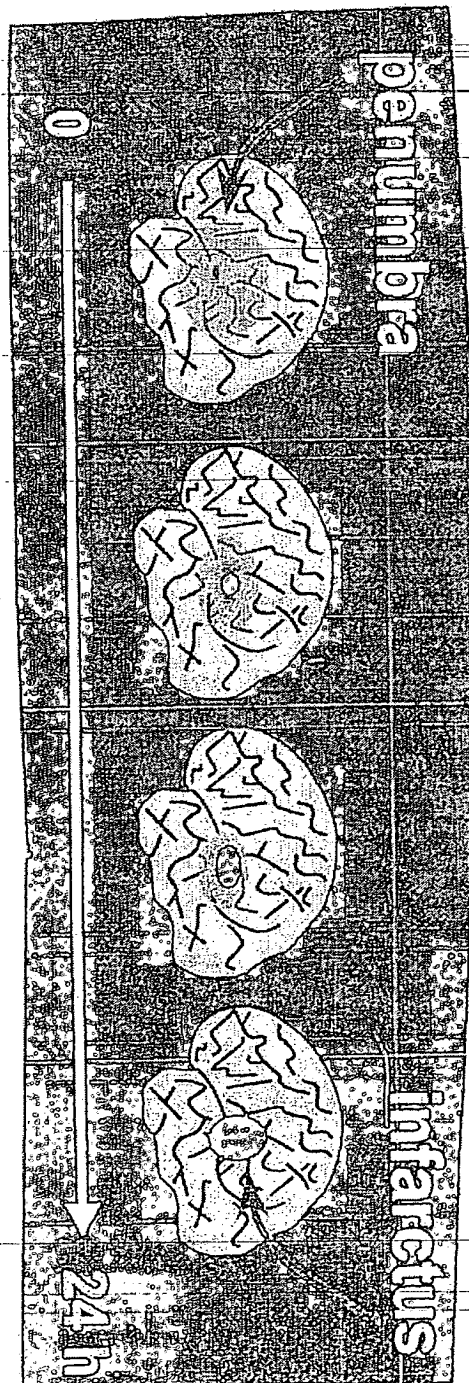
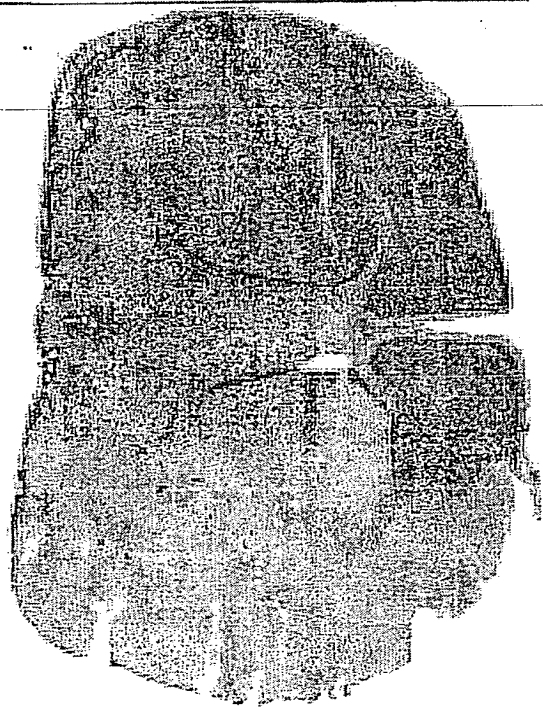


* $P < 0.05$

FIG.4

BEST AVAILABLE COPY

2/3



11
G
5

F
G
2

2/3

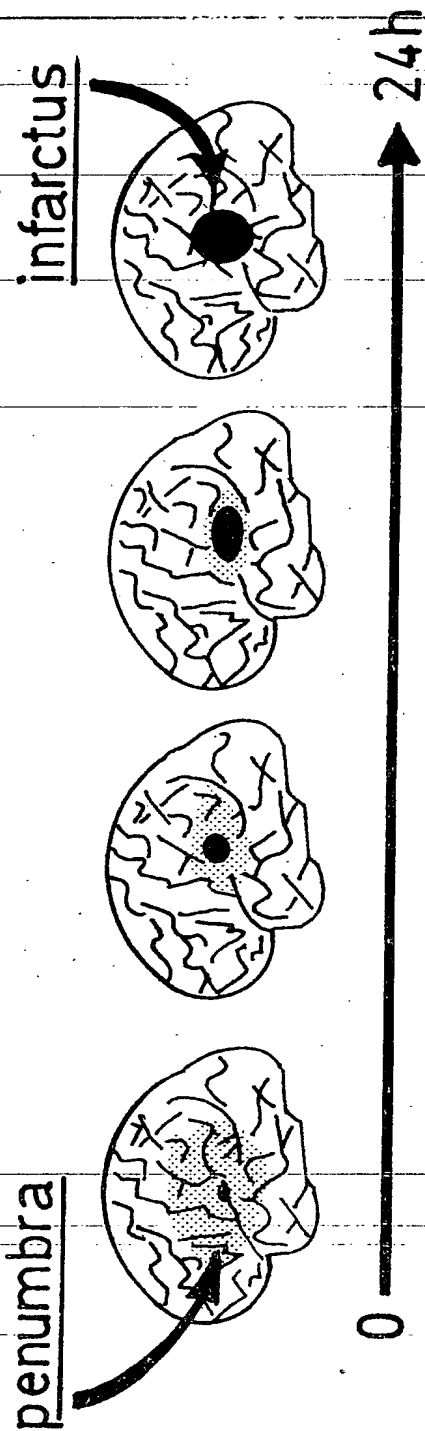


FIG.2

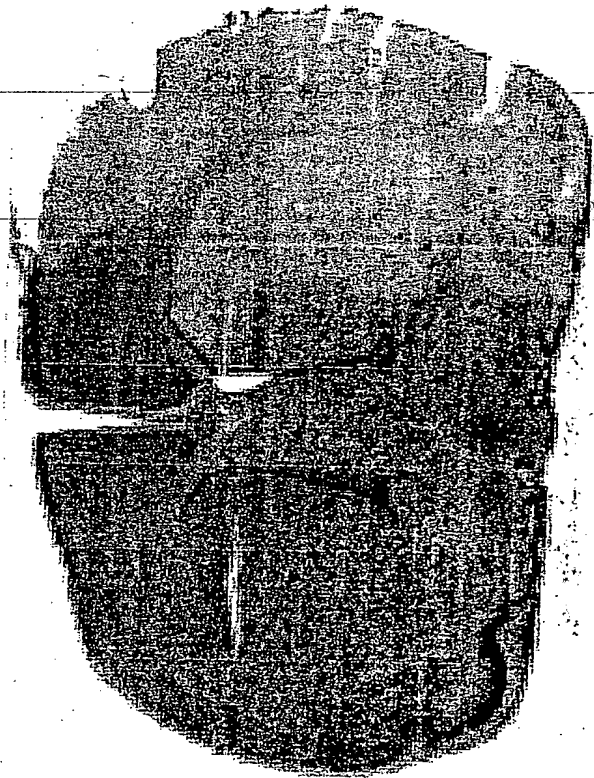


FIG.5

3/3

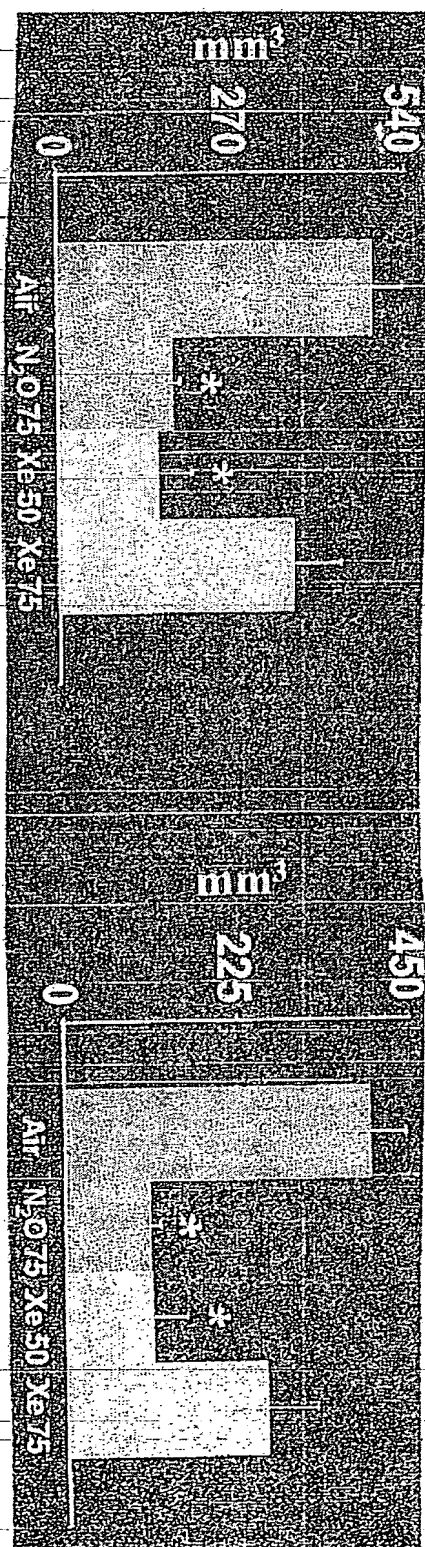


Fig. 3a

Fig. 3c

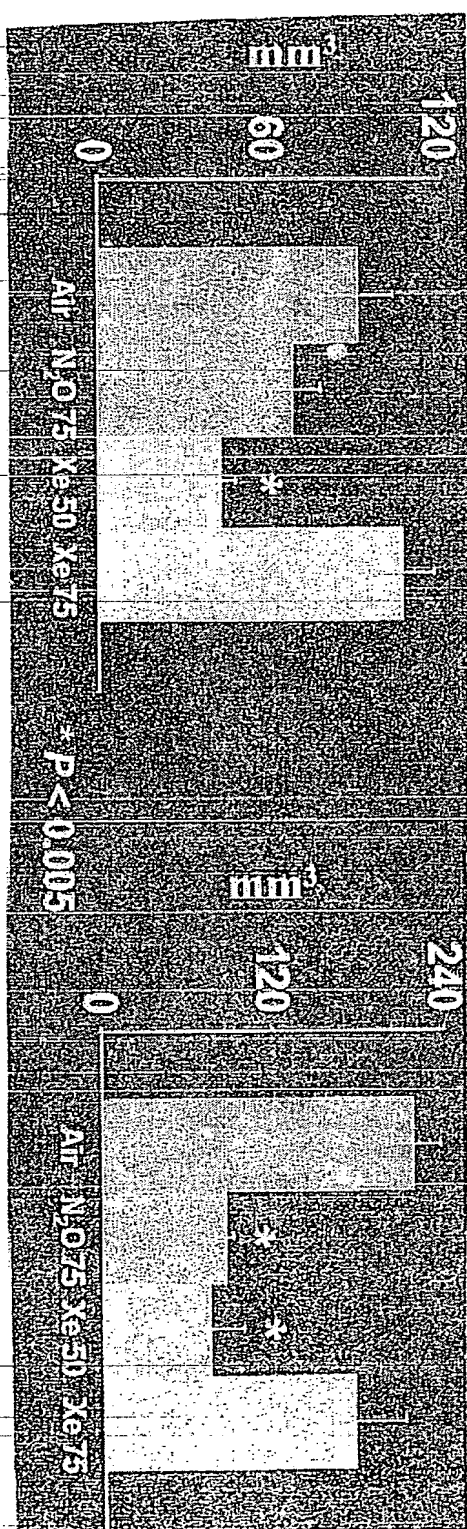


Fig. 3b

Fig. 3d

3/3

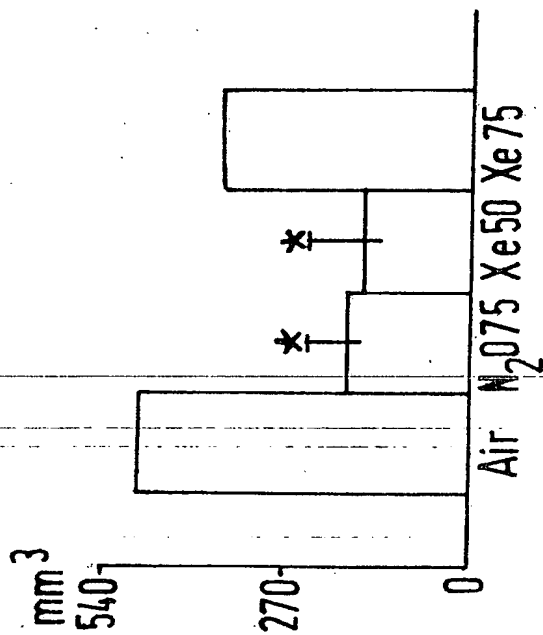


FIG.3a

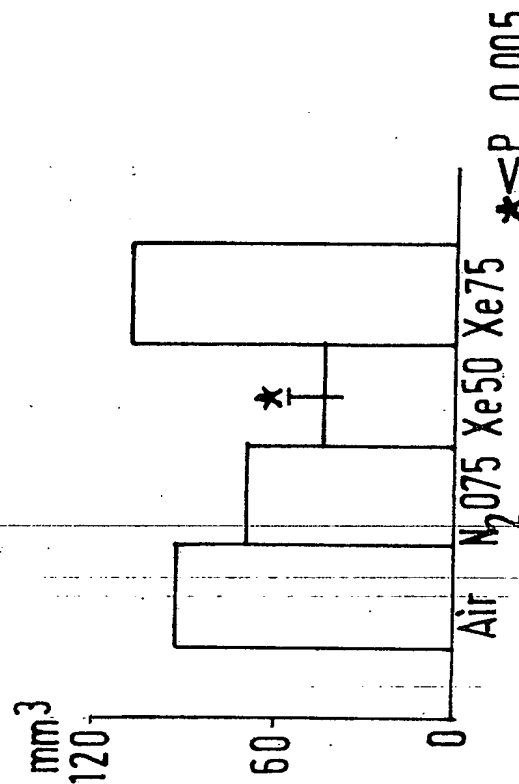


FIG.3c

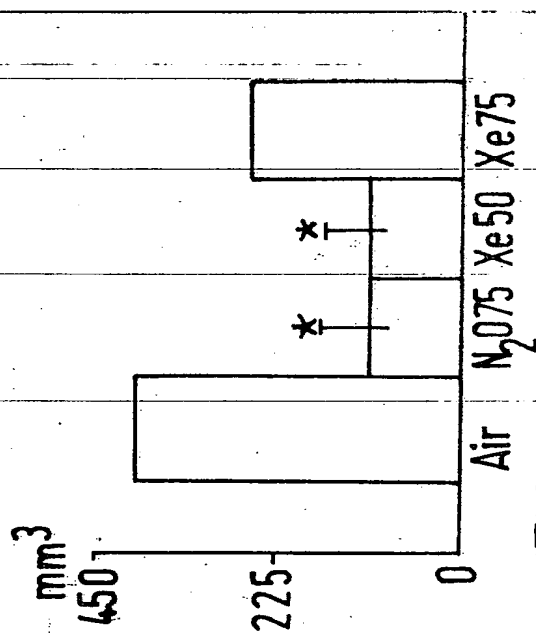


FIG.3b

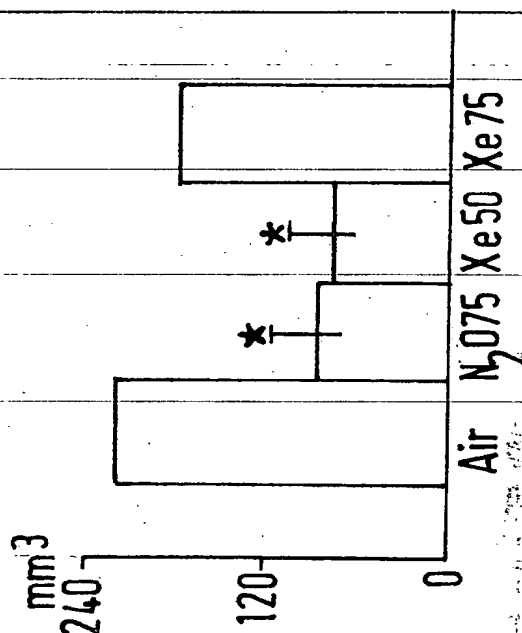


FIG.3d

**BREVET D'INVENTION**
CERTIFICAT D'UTILITE**Désignation de l'inventeur**

Vos références pour ce dossier	S6093 ALSI OP
N°D'ENREGISTREMENT NATIONAL	
TITRE DE L'INVENTION	
	UTILISATION DE XENON OU DE N2O DANS LE TRAITEMENT DES DETERIORATIONS CELLULAIRES CEREBRALES POST-ISCHEMIQUES
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	LEMAIRE
Prénoms	Marc
Rue	6 rue Joanes
Code postal et ville	75014 PARIS
Société d'appartenance	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

BEST AVAILABLE COPY